
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



EFFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Amphipterygium adstringens*
EN LA SOBREVIVENCIA DE RATONES INMUNOSUPRIMIDOS POR LA LÍNEA
TUMORAL L5178-Y

TRABAJO DE TITULACION EN LA MODALIDAD DE
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

PRESENTA

NICOLAS BIZARRO HERMOSILLO

Las Agujas, Zapopan, Jal., Junio de 2008



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura en Biología

1334 C. C. BIOLÓGIA

C. NICOLAS BIZARRO HERMOSILLO

PRESENTE

Manifestamos a ustedes que con esta fecha ha sido **aprobado** su tema de titulación en la modalidad de: **Tesis e Informes Opción Tesis**; con el título: **"Efecto del extracto acuoso de *Amphypterygium adstringens* en la sobrevida de ratones inmunosuprimidos por la línea tumoral L5178-Y"** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo el: **Dr. Jorge Peregrina Sandoval** y como asesor el **Dr. Edgardo Flores Torales**.

Sin más por el momento, le envío un afectuoso saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
Las Agujas, Zapopan., 02 de junio del 2008.


DR. FRANCISCO MARTÍN HUERTA MARTÍNEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN




M en C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN


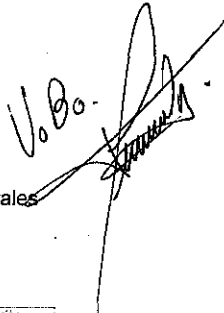
Dr. Fco. Martín Huerta Martínez.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente


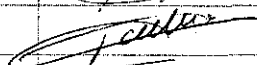
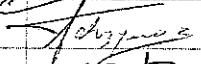

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad , tesis con el título: **"EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Amphypterygium adstringens* EN LA SOBRE VIDA DE RATONES INMUNOSUPRIMIDOS POR LA LINEA TUMORAL L5178-Y"** que realizó el pasante **Nicolás Bizarro Hermosillo** con número de código **394272874** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
 Las Agujas, Zapopan., 13 de Mayo de 2008


 Dr. Jorge Peregrina Sandoval
 Director del trabajo,

 
 Dr. Edgardo Flores Torales
 Asesor

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Ramón Reynoso Orozco		13/mayo/08
Q.F.B. Adolfo Cárdenas Ortega		13-05-08
Ocean. Salvador Velázquez Magaña		130508
Supl. Dra. Anne Santerre Lucas		13 mayo 2008

La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Inmunobiología del Departamento de Biología Celular y Molecular de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

Dirigida por:

Dr. Jorge Peregrina Sandoval

Asesorado por:

Dr. Edgardo Flores Torales

AGRADECIMIENTOS

A DIOS O LO QUE SEA QUE HAYA MAS ALLA DE NUESTRA EXISTENCIA.

*A MIS PADRES Y MIS HERMANOS QUE FORMAN PARTE DE LO QUE
SOY.*

*A TODOS AQUELLOS QUE ESTUVIERON A MI LADO, QUE SIN SER MIS
PARIENTES SON PARTE DE MI FAMILIA.*

A MONI POR SER UN REVULSIVO EN MI VIDA.

A DORIS Q ME AYUDO TANTO EN LA TRAMITOLOGIA.

*A LOS DRES. ARTURO, JORGE, EDGARDO, Y A MIS SINODALES
SALVADOR, RAMON, ADOLFO Y ANNE POR SU PACIENCIA Y AYUDA.*

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	iv
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
INMUNOMODULACIÓN CON PRODUCTOS NATURALES	5
TAMIZADO FARMACOLÓGICO DE PLANTAS MEDICINALES	6
LINFOMA MURINO L5178Y	7
JUSTIFICACIÓN	8
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
HIPÓTESIS	9
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS PARTICULARES	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
MATERIAL VEGETAL	10
TRANSPLANTE SERIADO DEL TUMOR L5178Y	10
GRUPOS DE ESTUDIO	10
DISEÑO EXPERIMENTAL	11
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	11
RESULTADOS	12
DISCUSIÓN	15
CONCLUSIONES	16
BIBLIOGRAFIA	17

Resumen

Este trabajo determino el efecto del extracto acuoso de la corteza de *Amphipterygium adstringens* en ratones inmunosuprimidos con la línea tumoral L5178-Y, se utilizaron ratones BALB/c de 6 a 8 semanas de edad con un promedio de peso de 20-24 gr, divididos en 4 grupos con 10 ratones cada uno que tuvieron agua y comida a libre acceso, el tumor se implanto de forma intraperitoneal y el extracto se dosifico de manera orogástrica; se tomo el grupo 1 como control, sin aplicar el linfoma, al grupo 2 se le dosifico el extracto acuoso 7 días antes de la implantación del linfoma, al grupo 3 se le implanto el tumor y solo se le dosifico agua como placebo para aplicar el mismo estrés de manejo, el 4 grupo se le dosifico el extracto 7 días después de implantado el tumor, la dosis establecida para el experimento fue de 100 mg/Kg/día.

El comportamiento de los grupos fue muy similar, pero al evaluarlos estadísticamente, se demostró que el grupo 2 tuvo un aumento significativo en la sobrevida, gracias a la estimulación del sistema inmune de manera inespecifica, por lo tanto se concluye que el extracto acuoso de *Amphipterygium adstringens* no tiene un efecto anticancerígeno como lo señala la literatura etnobotánica.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo del hombre se ha acompañado de atribuciones mágicas y curativas imputadas a las plantas medicinales, por ello éstas han tenido una intervención directa en la vida humana para satisfacer los requerimientos tanto alimenticios como de salud. Las plantas medicinales son utilizadas como remedios populares en diversas culturas desde hace tiempo.

Civilizaciones del Mediterráneo descubrieron propiedades curativas en plantas y sus compuestos como el ricino (Egipto), la Belladona (Italia), la colchicina (Grecia), el opio en la amapola (Medio Oriente), y los Chinos encontraron el ginseng, la efedrina, el gordolobo, etc. [1].

En el México prehispánico se tenían conocimientos sistematizados de plantas y animales, por lo que sus clasificaciones eran avanzadas e incluían datos de usos, propiedades, formas, hasta ecología. Según documentos históricos, los Toltecas heredaron sus conocimientos sobre plantas medicinales a los aztecas, en éste periodo, se construyeron jardines botánicos con fines ornamentales y medicinales [1]. El conocimiento tradicional era transmitido a través de códices o por enseñanzas verbales.

Existen evidencias directas e indirectas, bajo contextos arqueológicos referentes a plantas medicinales, representadas en murales, iconografías y utensilios de rituales asociados al tratamiento y diagnóstico de enfermedades [2]. Así mismo, en cuevas se han encontrado semillas, frutos y hojas de plantas como la flor de mayo (*Plumeria rubra* var. *Acutifolia*); calabaza (*Cucúrbita* sp); peyote (*Lophophora lewinii*); aguacate (*Persea americana*); zapote blanco (*Casimiroa edulis*), epazote (*Teloxys ambosioides*), etc. que no sólo dan cuenta de su cultivo sino también de su uso con fines medicinales [3].

Se tiene conocimiento de las plantas medicinales en documentos como el Manuscrito Badiano (1552), escrito en nahuatl por el indígena Martín de la Cruz y

traducido al latín por Juan Badiano [4]. Ésta obra presenta dibujos a color de 150 plantas autóctonas y sus propiedades curativas.

En 1559 el Fraile Francisco Bernadino Sahagún recibió la orden de escribir en lengua mexicana la historia, religión, organización sociopolítica y costumbres de las culturas indígenas prehispánicas, el códice Florentino (Historia de las cosas de la Nueva España), en el libro XI describió la ciencia agrícola y botánica.

El primer documento científico escrito sobre plantas medicinales americanas llamado Tratado de las Plantas Medicinales de la Nueva España, fue escrito por el médico español Nicolás Monardes en 1569 [5]. En dicha obra se describen por vez primera la guayaba, la coca, la piña, el tabaco y la pimienta gorda entre otras. Debido a su excelente descripción de las nuevas drogas vegetales se le considera uno de los precursores de la farmacognosia americana.

Es probable que debido a éstos trabajos, en 1571 se inició la expedición botánica más importante de la época a cargo de Francisco Hernández que recolectó y describió plantas y animales de México en la obra Historia Natural de la Nueva España [6]. La obra de Hernández fue resumida con respecto a los productos medicinales por Nardo Antonio Recco (1649-1650) con el título de "Rerum Medicarum.Novae Hispaniae. Thesaurus seu Plantarum Animalium Mineralium Mexicanorum".

La colonización por los españoles modificó radicalmente la medicina nativa y los usos de las plantas medicinales, ésta transición se manifiesta en la concepción nativa del Manuscrito Badiano y los conceptos europeos del Códice Florentino [7].

La etnobotánica aborda el estudio sistemático y la investigación multidisciplinaria de las plantas medicinales, bajo un contexto antropológico, ecológico y científico. Hoy en día, los países del primer mundo utilizan fármacos cuyo origen y modelo se han obtenido de productos vegetales.

De ésta manera, actualmente son objeto de estudio científico, los principios activos de las plantas populares como fuente de nuevas drogas y su efecto en la

salud. A pesar de la riqueza y variedad (existen de 10 a 15 mil plantas medicinales a las cuales se les atribuye algún efecto vinculado con la salud), sólo un 5% de la flora mexicana ha sido investigada a nivel fitoquímico, farmacológico y biológico [8].

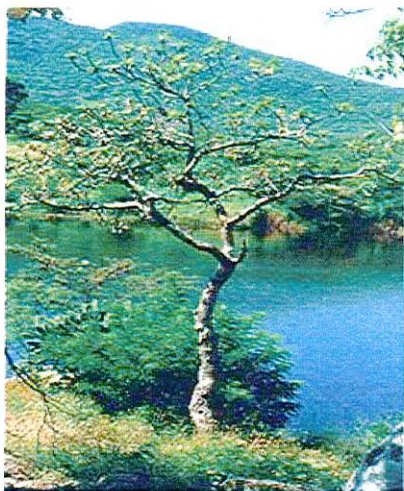
ANTECEDENTES

En años recientes se han reportado estudios de extractos así como de principios activos extraídos de plantas medicinales, que muestran propiedades inmunomoduladoras en padecimientos como cáncer, autoinmunidad, infecciones virales, alergias, etc. Tal es el caso, de un extracto acuoso del alga verde azul *Spirulina*, la cual inhibió *in vitro* la replicación del VIH-1 en líneas celulares humanas [9].

Sandoval-Chacón y colaboradores utilizaron un extracto de la corteza de *Uncaria tomentosa* (uña de gato) el cual contenía alcaloides de oxi-indol; y presentó actividad antiinflamatoria involucrando la inhibición del factor transcripcional NF[k]B [10].

También, ha aumentado el interés en el estudio de flavonoides aislados de plantas medicinales. Un ejemplo de ello son la Quercetina y la Genisteína; éstos han mostrado un efecto anticancerígeno (antiproliferativo) a varios niveles: inhibiendo tirosin-cinasas, inhibiendo la conversión de estrógenos a andrógenos, en cáncer relacionado con hormonas, y por ello, se infiere su posible mecanismo de acción en la inhibición de reproducción de células malignas en cáncer de próstata, mama y matriz [11].

La familia Julianaceae es muy importante para el pueblo mexicano por su utilidad medicinal, al parecer desde épocas prehispánicas; ha sido objeto de estudios etnobotánicos, químicos, farmacológicos y toxicológicos; La corteza de sus árboles, en este caso *Amphipterygium adstringens*, se utiliza para curar diversos males, tales como malaria, cáncer de estomago y ulcera gástrica.



Se le conoce en general como cuachalalate o cuachalala y en las diferentes entidades se le ha fijado una variedad de nombres: Matixerán, Pacueco y Palo Santo en Michoacán, Volador en Puebla y Estado de México y Cuachinala en Oaxaca. Árbol de 4 hasta 10 m de altura; corteza arrugada, de color rosa-grisáceo, verrugosa con protuberancias corchosas, las hojas están agrupadas en las puntas de las ramas y sus flores pueden ser solitarias, la madera es de color crema claro a crema rosado con olor picante y sabor astringente [12]; habita

principalmente en la región montañosa y declives del pacífico, en zonas cubiertas por bosque tropical caducifolio, en el estado de Jalisco hacia el centro-sur, en los municipios de Autlán de Navarro, El Grullo, Jilotlán de los Dolores, El Limón, Tecolotlán, Tolimán, Tuxcacuesco, y Zacoalco de Torres [13]; crece en climas cálido, semicálido y templado. Habita en la selva tropical caducifolia, subcaducifolia, matorral serófilo y bosques mesófilo de montaña, de encino y pino. Se localiza en varias regiones del país, particularmente en la región noroccidente de México [14].



Se le encuentra desde el nivel del mar hasta los 1500 metros sobre el nivel del mar; florece de junio a agosto, fructifica de agosto a enero; la corteza se usa comúnmente para curar diversas enfermedades, como la malaria, cáncer de estómago, úlcera gástrica y en el tratamiento de males renales, pulmonares y resfriados, para evitar la caída del pelo, aliviar el dolor de muelas, contra la fiebre tifoidea, lombrices, diarrea y disentería, así como cicatrizante y antiinflamatorio; además en el ámbito farmacológico se ha comprobado su utilidad hipocolesterolemizante [13]

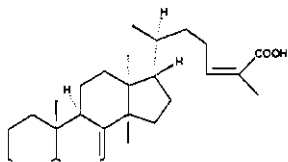
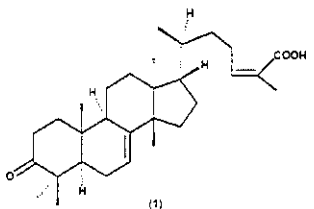


Fig. 8 Ácido masticadienoico y 3- α -hidroximasticadienoico.
Fuente: Oviedo-Chávez, 2004.

Francisco Hernández en el siglo XVI, menciona las características y propiedades de ésta especie. En el siglo XX, la Sociedad Farmacéutica de México lo registró como astringente. Toda la investigación química de éste árbol se ha realizado en México. Se identificó en la corteza los siguientes compuestos: sarsapogenina [15], el ácido cuachalico y ácido instiopolinacico [16], los triterpenos ácidos: 3- α y 3-eumasticadienoico [17], ácido anacárdico, aldehidos fenólicos, isomasticadienoico y epipolenólico, ácido 6-hepatadecil, 6-nonadecil, y 6

pentadecilsalicílico. En los árboles femeninos, existe mayor acumulación de los ácidos masticadienoico, alfa-hidroximasticadienoico, así como mezclas de masticadienoico/isomasticadienoico; en los árboles masculinos se encontraron en mayor proporción la mezcla de ácido alfa-hidroximasticadienoico y un compuesto desconocido [18].

En estudios hechos en el laboratorio de Inmunobiología del CUCBA, se comprobó la actividad inmunoestimuladora del extracto acuoso de *Amphipterygium adstringens*, se analizaron los efectos en la respuesta inmune celular *in vivo* e *in vitro*; se evaluó por medio de la prueba de hipersensibilidad por contacto directo al DNFB y linfoproliferación con la técnica colorimétrica utilizando MTT respectivamente [19].

INMUNOMODULACIÓN CON PRODUCTOS NATURALES

La actividad inmunomoduladora se refiere a los efectos biológicos o farmacológicos sobre factores humorales o celulares que pueden ser específicos o inespecíficos y afectan las fases de la respuesta inmune [20]. La

inmunomodulación con sustancias naturales incluye la influencia sobre el sistema inmune tanto positiva (estimulante) como negativa (supresora) [21].

La OMS ha definido requerimientos especiales para los inmunomoduladores obtenidos de fuentes naturales, por ejemplo: la degradación biológica rápida, sin efectos colaterales, químicamente puros, sin toxicidad aguda o crónica, por mencionar algunos [21].

Los inmunomoduladores derivados de productos naturales pueden ser clasificados con base en los principios activos que se han aislados de ellos, siendo principalmente carbohidratos, terpenos, esteroides, fenoles, coumarinas, aminoácidos, péptidos, glicoproteínas y alcaloides. Los compuestos naturales pueden fácilmente interactuar con inmunofactores funcionales e inmunosistemas. Por ejemplo, muchos péptidos de extractos naturales pueden unirse al MHC I y II, al TCR y otros receptores de membrana, tanto *in vivo* como *in vitro* [20]. Dentro de este contexto, es conocido el efecto la Concanavallina A (obtenida de la planta *Canavalia ensiformis*) que es una lectina específica de residuos de manosa. Esta lectina produce un entrecruzamiento indirecto con el TCR y funge como mitógeno del Linfocito T [22], así mismo los lipopolisacáridos (de origen bacteriano) estimulan la expansión clonal de los linfocitos B y macrófagos. Estas son sustancias naturales ampliamente utilizadas en la estimulación metabólica en ensayos inmunológicos.

Por otra parte, los compuestos fenólicos presentes en las plantas, intervienen química y bioquímicamente con los sistemas de transferencia de electrones o con enzimas óxido-reductoras protegiendo del daño al ADN celular [23].

TAMIZADO FARMACOLÓGICO (SCREENING) DE PLANTAS MEDICINALES

Es un proceso selectivo que exige evaluar si las plantas poseen o no actividad farmacológica. En la validación del uso terapéutico tradicional, se trata de determinar la eficacia y seguridad de las plantas medicinales. Por ello, en el

tamizado, los extractos naturales se someten a sistemas *in vitro* como son la prueba de citotoxicidad (en células tumorales), la cuantificación de leucotrienos e interleucinas, la inducción de IFN- γ etc., así como sistemas *in vivo* tales como el ensayo de hipersensibilidad por contacto utilizados en diversos modelos animales [24]. Tanto la industria farmacéutica como el Instituto Nacional de Cáncer de EUA (NCI) han desarrollado sistemas experimentales para el tamizado farmacológico de plantas medicinales con la finalidad de obtener nuevos medicamentos. Por ejemplo, actualmente el NCI lleva a cabo un programa de Investigación acerca del descubrimiento de nuevos fármacos antitumorales obtenidos de fuentes naturales, como son las plantas medicinales e invertebrados marinos. El tamizado consiste en la obtención de un extracto acuoso y un extracto orgánico para probar su actividad anticancerosa contra múltiples líneas tumorales. Si los extractos poseen efecto, se obtienen fracciones de los mismos y se realizan nuevos ensayos biológicos en animales de laboratorio. Finalmente, las fracciones que muestran actividad y baja toxicidad se estudian en ensayos pre-clínicos y clínicos [21]. Tal es el caso de los alcaloides antileucémicos vinblastina y vincristina que fueron aislados de la planta *Catharanthus roseus* [25] y el Taxol obtenido en 1994 a partir de la corteza de *Taxus brevifolia* el cual se utiliza en el tratamiento de cáncer de mama y de ovario [21].

LINFOMA MURINO L5178-Y

En el presente trabajo se utilizó el linfoma murino L5178-Y como modelo de inmunosupresión. Es un linfoma tímico de origen espontáneo en ratones de la cepa DBA/2, que fue adaptado en forma ascítica y mantenido por trasplante seriado en dicha cepa [26]. Sin embargo, se ha conservado en la cepa BALB/c con la cual es compatible en antígenos tisulares en el locus H2^{d/d} [27].

En la cepa BALB/c se establece el estado de inmunosupresión en el día 7 de evolución del linfoma, cuando se inoculan 1×10^7 células vía intraperitoneal [28].

JUSTIFICACIÓN

La literatura reporta que la corteza de *Amphipterygium adstringens* es utilizada en la Medicina Tradicional Mexicana para tratar heridas, úlceras gástricas, hipercolesteronemia y cáncer gástrico entre otros [8, 14]. Estudios científicos utilizando diversos solventes de extracción, avalan su efecto antimicrobiano [29, 30], antiulceroso [24], anti-inflamatorio [31], citotóxico [15]. Sin embargo, el extracto acuoso de la corteza (forma de uso etnomédico) no se había probado en un modelo de tumor.

Por esta razón, el propósito de éste trabajo fue evaluar el efecto que presenta el extracto acuoso de la corteza de *Amphipterygium adstringens* administrado vía oral como lo refiere la etnobotánica, en la sobrevivida de ratones con y sin linfoma murino L5178-Y.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En estudios anteriores, en nuestro laboratorio (Ramirez Leon- Orozco Barocio; datos sin publicar), se observó una actividad inmunoestimuladora del extracto acuoso de *Amphipterygium adstringens*, en ratones inmunosuprimidos con el linfoma murino L5178-Y.

No se conoce si el efecto inmunestimulador del extracto acuoso tiene efectos favorables en la sobrevivida de ratones BALB/c inmunosuprimidos con el linfoma murino L5178-Y por lo que creemos que este estudio es de gran relevancia ya que puede representar las bases para un tratamiento alternativo para combatir los efectos de algunas neoplasias.

HIPÓTESIS

La aplicación por vía oral del extracto acuoso de la corteza *Amphipterygium adstringens* aumenta la sobrevida de ratones BALB/c, inmunosuprimidos con el Linfoma murino L5178-Y.

Hipótesis nula, Ho- Todos los tratamientos son iguales entre si.

Hipótesis Alternativa, Ha- Al menos un tratamiento es diferente

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del extracto acuoso de la corteza de *Amphipterygium adstringens* en la sobrevida de ratones inmunosuprimidos por el Linfoma murino L5178-Y.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener un extracto acuoso de la corteza de *Amphipterygium adstringens* mediante maceración.
2. Evaluar la sobrevida de ratones BALB/c inoculados con células de linfoma murino L5178-Y con y sin el tratamiento con extracto acuoso de *Amphipterygium adstringens*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal.

Extracción y preparación de la muestra. El extracto acuoso se obtuvo mediante una infusión de 20g de corteza seca y molida de cuachalalate en 1 litro de agua, posteriormente se concentró dicho extracto a 25% de su volumen en un rotovapor y se liofilizó.

Transplante seriado del tumor L5178-Y.

El tumor fue transplantado serialmente de un ratón inoculado a un ratón sano cada 30 días para evitar la desaparición del mismo y para evitar su degradación, se obtuvieron células tumorales mediante una jeringa de insulina, se lavaron y se contabilizaron para su dosificación; la misma cantidad aproximadamente (2×10^4 células), la implantación de las células cancerosas se hizo vía intraperitoneal.

Grupos de estudio

Se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c (7-8 semanas de edad, de 20-24 gr de peso) con una $n = 10$ por grupo. Se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio con comida y agua a libre acceso, se observaron diariamente registrando cambios y decesos.

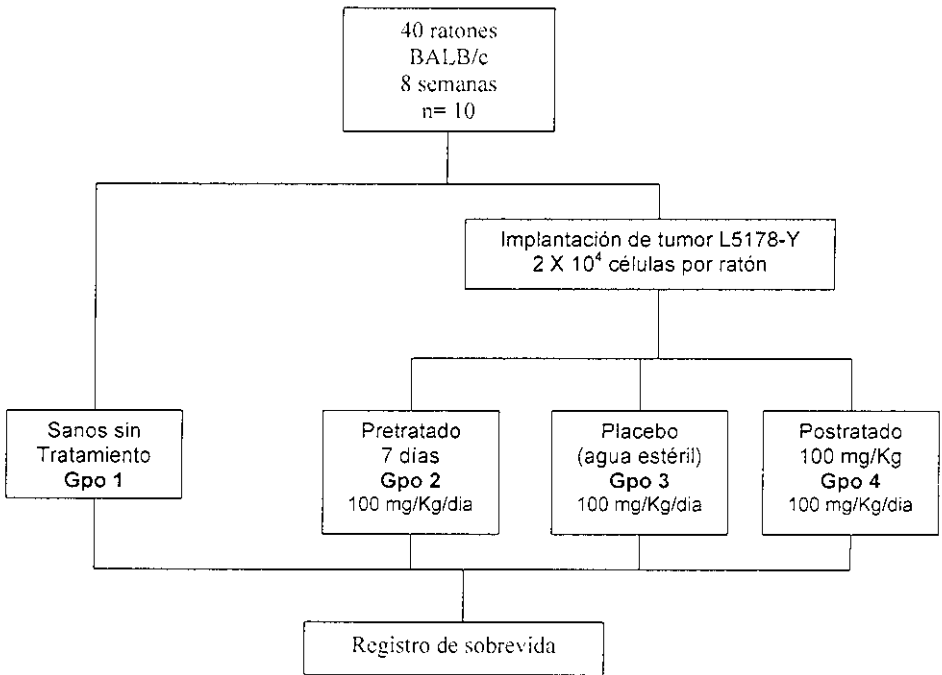
Grupo 1: Ratones sanos sin tratamiento como grupo control.

Grupo 2: Ratones pretratados con de 100 mg/Kg/día vía oro gástrica del extracto acuoso de *Amphipterygium adstringens* durante 7 días antes de ser inmunosuprimidos con el linfoma L5178-Y (2×10^4 células)

Grupo 3: Ratones inmunosuprimidos con el linfoma L5178-Y (2×10^4 células) tratados con agua estéril (placebo); 0.1 ml vía oro gástrica por día durante 10 días.

Grupo 4: Ratones inmunosuprimidos con el linfoma L5178-Y (2×10^4 células), tratados con el extracto de *Amphipterygium adstringens*, 100 mg/Kg/día durante 10 días a partir del 5° día después de la implantación del tumor.

DISEÑO EXPERIMENTAL



ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

La evaluación estadística de los datos de sobrevida fue hecha mediante el análisis unilateral de la varianza de jerarquías de la prueba de H de Kruskal-Wallis, para determinar si había diferencias entre los grupos experimentales, y sometidos después al procedimiento de Bonferroni sobre la U de Mann-Whitney, para determinar que grupo era diferente del otro; comparando los grupos entre si y evaluando la significancia, que para este experimento fue del 95%; para comprobar la evaluación, se utilizo el programa estadístico minitab.

Se utilizo la estadística no paramétrica porque los datos son cualitativos[38].

RESULTADOS

Obtención del Liofilizado del Extracto Acuoso (EA) de *Amphypterygium adstringens*.



Se utilizó la infusión como procedimiento de extracción del extracto acuoso de la corteza de *Amphypterygium adstringens*.

El liofilizado se obtuvo como un polvo café rojizo con un rendimiento de 5%(p/p) que es hidrosoluble.

Sobrevida de ratones portadores de Linfoma L5178-Y tratados con el EA de *Amphypterygium adstringens*.

Se registró el día de muerte en los ratones inmunosuprimidos con el linfoma murino L5178-Y, con y sin tratamiento del EA de *Amphypterygium adstringens* y les fue asignado un porcentaje de sobrevida, se analizaron los datos mediante la prueba de Kruskal-Wallis, los rangos fueron asignados para cada evento no importando en que experimento se encontraba, fueron comparándose entre si para determinar si había diferencias, lo cual arrojó como resultado el rechazo de la H_0 , por lo que se aplicó el procedimiento de Bonferroni sobre la U de Mann-Whitney para determinar que grupo era diferente de los demás, dichos resultados se encuentran en la tabla 1.

A continuación se muestra la grafica, en la cual, los puntos representa un evento y el total forma la curva de sobrevida.

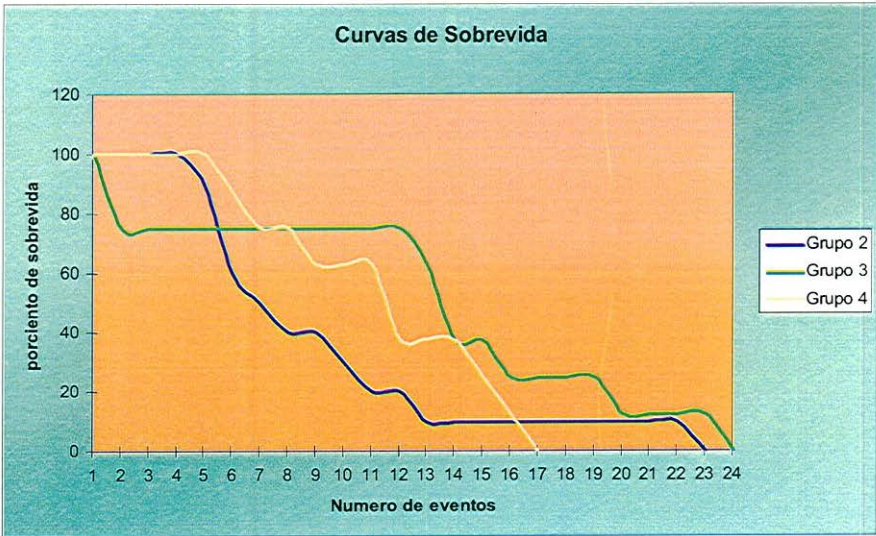


Tabla 1. Estadísticos críticos contra los estadísticos calculados.

Grupo	Grupo	critico	calculado	Significancia
2	Vs 4	2.13	1.82	no significativo
3	Vs 4	2.13	1.23	no significativo
2	Vs 3	2.13	2.30	Significativo

La comparación del estadístico calculado contra el estadístico crítico entre el grupo 2 (pretratado) contra el grupo 4 (postratado) no presento diferencias significativas, de acuerdo al valor crítico obtenido de tablas que fue 2.13 contra el valor calculado de la comparación entre grupos que fue de 1.82, por lo tanto se rechaza H_0 y se concluye que los eventos si son muy parecidos por lo tanto el EA de *Amphypterygium adstringens* no tiene ningún efecto que diferencie de ninguno de estos experimentos entre si y por lo tanto que le signifique mayor sobrevida.

La comparación de los estadísticos entre los grupos 3 (placebo) y 4 (postratado) de igual manera no presento diferencias significativas de acuerdo al valor critico de tablas que fue de 2.13 contra el valor obtenido de la comparación entre grupos que fue de 1.23, por lo tanto se rechaza H_0 y se concluye que el EA de *Amphypterygium adstringens* no tiene ningún efecto que eleve la sobrevida respecto al grupo al que no se le administro.

Pero la comparación de los estadísticos del grupo 4 (pretratado) contra el 3 (placebo) presento diferencias significativas de acuerdo al valor critico de tablas que fue de 2.13 contra el valor obtenido de la comparación de grupos que fue de -2.30, por lo tanto se acepta H_0 y se concluye que el EA de *Amphypterygium adstringens* si tiene algún efecto que eleva la sobrevida respecto al grupo al que no se le administro.

La grafica nos muestra que las curvas tienen tendencias muy parecidas, y en la prueba de kruskal-Wallis del programa de minitab los resultados se traslaparon, pero con el procedimiento de Bonferroni el grupo 2 pretratado demostró estadísticamente, que si tiene diferencias significativas ya que se compararon los eventos individualmente.

DISCUSIÓN

En conjunto, el tratamiento con el extracto acuoso de *Amphipterygium adstringens* incremento la sobrevida en el grupo experimental 4 denominado como pretratado, en este contexto, el extracto acuoso de *Amphipterygium adstringens* se comporta como un Inductor parainmune; estas sustancias son inmunomoduladores obtenidos de fuentes naturales que estimulan temporalmente al sistema inmune deprimido y principalmente influyen en los mecanismos de defensa inespecíficos [36, 37], y no como un agente citotóxico que actué directamente contra las células tumorales esto debido a que el linfoma murino L5178-Y es un cáncer muy agresivo que produce un estado de inmunosupresión severa en el huésped, debido a la presencia de factores inmunosupresores séricos y en el líquido ascítico [33] como la IL-10 [34]. De la misma forma, se ha encontrado que las células L5178-Y producen un factor inhibidor de la activación del macrófago. Aunado a esto, es conocido que el trasplante seriado de células tumorales reduce la susceptibilidad de la misma ante los mecanismos de defensa natural [35].

Por ello, será conveniente estudiar el efecto de éste extracto manipulando las variables, tales como, la utilización de otras vías de administración, la dosis/frecuencia y duración del tratamiento, los cuales podrían incrementar aun mas el tiempo de sobrevida.

CONCLUSIONES

Se demostró estadísticamente que el extracto acuoso de *Amphipterygium adstringens* aumento la sobrevida del grupo experimental 2 que fue pretratado 7 días antes de la implantación del linfoma, por lo tanto el efecto es inmunomodulador, tal y como se había visto en resultados anteriores de nuestro laboratorio y no actúa de manera citotóxica como lo demostró el grupo 4 el cual no tuvo una diferencia significativa en el aumento de sobrevida, que demostrara lo que describe la herbolaria tradicional.

El grupo pretratado tuvo una diferencia significativa debido a que su sistema inmune estaba estimulado por extracto acuoso de *Amphipterygium adstringens* por lo que presento una mejor respuesta inespecífica contra las células tumorales a pesar de su agresividad.

Se observo además que el modelo del linfoma L5178-Y no es el ideal para este tipo de estudios, debido a su gran agresividad y a que su transplante seriado reduce la respuesta inmune natural del huésped.

Además se probó que la literatura etnobotánica le atribuye a *Amphipterygium adstringens* propiedades anticancerígenas, las cuales no fueron demostradas, por lo menos en este modelo.

BIBLIOGRAFIA

1. Cuapio, S., Herbolaria.webmaster@internet.com.mx.
2. Lozoya, X., *Un paraíso de plantas medicinales*. Revista de Arqueología Mexicana, 1999. **8**(39): 14-21.
3. Bye, R.L. E. *Plantas Medicinales del México Prehispánico*. Revista Arqueologica Mexicana, 1999. **8**(39): 4-11.
4. Emmart, E.W., *The Badianus Manuscript (codex Barberini, Latin 241)*. Vatican library; an Aztec herbal of 1552. The Johns Hopkins Press. Baltimore, 1940.
5. Boxer, C.R., *Two pioneers of tropical medicine*. Welcome Historical Library. London, 1963.
6. Grobet, R., *El peregrinar de las flores Mexicanas*. CECSA-INIREB, México., 1983: 1757-1822.
7. Gomez-Pompa, A., *Las raíces de la etnobotanica Mexicana*. Publicaciones biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León., 1993. **1**: 84-94.
8. Estrada, E., *Plantas Medicinales de México. Introducción a su estudio*. Universidad Autónoma de Chapingo, Unidad de Estudios Etnobotánicos, Programa Universitario de Plantas Medicinales, Departamento de Fitoterapia, Centro de Agroforestería para el Desarrollo Sostenible, 1992.
9. Ayeuhine, S., Belay, A., Baba, T., Ruprecht, R., *Inhibition of HIV-1 Replication by an Aqueous extract of Spirulina platenses (Arthrospira platenses)*. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology., 1998. **18**(1): 7-12.
10. Sandoval-Chacón, M., Thompson, J.H., Zhang, X-J., Liu, X., Mannick, E.E., Sadowske-Krowicka, H., Charbonet, R.M., Clark, D.A., Miller, M.J.S., *Antiinflammatory actions of cat'sclaw: the role of NF[kappa]B*. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 1998. **12**(12): 1279-1289.
11. Adlercreutz, H., *Evolution, Nutrition, Intestinal Microflora, and Prevention of Cancer*. Precedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1998. **217**(3): 241-246.
12. Pennington, T.D.S.J., *Árboles Tropicales de México*. UNAM (Instituto de Ecología). Fondo de Cultura Económica, 1998.
13. Cuevas Figueroa, X.M., *La familia Julianaceae en el estado de Jalisco, México*. Universidad de Guadalajara, México., 2001.
14. Argueta, A., *Atlas de las plantas Medicina Tradicional Mexicana*, tomo III: Instituto Nacional Indigenista, 1a Edición., 1994.
15. Gonzáles, E.E., Delgado, J.N., *Phytochemical investigation of Amphipterygium adstringens*. Journal of Pharmaceut. Sci., 1962. **51**: 786-790.
16. Domínguez, X., Franco, R., García, S., Porras, ;E., Vásquez, G., Amescua, B., *Plantas Medicinales Mexicanas SLVIII. Estructura del ácido instiopolinacico separado de la corteza del cuachalalate (Amphipterugium Adstringens)*. Revista Latinoamericana de Química., 1983. **14**: 99-100.

17. Soriano-García, M.T., R.A., Ortiz, B., Navarrete, A., Sánchez-Obregón, G.R., Barrios, H., Yuste, F., *Structure and Stereochemistry of methylester of (5a, 13a, 14b, 17a, 20s, 24z) 3-ixakabista-7, 24-dien-26-oic acid (masticadienoic acid)*. Acta Crystallographica C., 1987. **43**: 990-992.
18. Olivera-Ortega, A., Soto-Hernández M., Martínez-Vázquez, M., Terrazas-Salgado, T., Solares-Arenas, F., *Phytochemical study of cuachalalate*. J. of Ethnopharmacol., 1999. **68**(1-3): 109-113.
19. Barocio, R.L.-O., *Efecto inmunomodulador de A. adstringens en ratones BALB/c con linfoma murino L5178Y*. resultados sin publicar.
20. Colegate, S.M.M., R.J., *Bioactive Natural Products. Detection, Isolation, and Structural Determination*. CRC Press, Inc., 1993.
21. Bourzac, K., *Natural Products for Cancer Treatment*. Benchmarks . 2004. **4**(4): 1-2.
22. Rose, N., Conway, E., Clifford, L., *Manual of Clinical Laboratory of Immunology*. 5a. Edition. ASM Press. Washington D.C., 1997.
23. Rahman, A., Chourdhary, M.I., *Bioactive Natural Products as a potential Source of new pharmacophores. A theory of Memory*. Pure Appl. Chem., 2001. **73**(3): 55-560.
24. Navarrete, A.O., I.; Sánchez-Mendoza, M.; Arrieta, J.; Cruz-Antonio, L.; Castañeda-Hernández, G., *Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of Cuachalalate (Amphipterygium adstringens) on the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenac in rats*. J. Pharm. Pharmacol. **57**(12):1629-1636., 2005.
25. Dourus, J.D.C.J.y., *Anticancer Agents Based on Natural Product Models*. Nueva York Academic Press., 1980.
26. Alexander, P., *On the mode of action of some treatments that influence the radiation sensitivity of cells*. Trans.N.Y.Acade. Sci. Series II., 1962. **24**: 966-978.
27. Gómez-Estrada, H.A.-R., R.; Ramos-Damian, ME.; Alpuche-Villanueva, J.; González-Marmolejo, R.; Rayon-Ríos, F., *Arch. Invest. Méd. (Méx)*. Arch. Invest. Méd. (Méx). 1979. **10**: 187-200.
28. Orozco-Barocio, A., *Modulación de la respuesta inmune en ratones BALB/c con linfoma murino L5178-Y tratados con acibar de Aloe vera*. Tesis Doctoral. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara., 1998.
29. Tyman, J.H.P., *Non-isoprenoid long chain phenols*. Chem.Soc. Reviews., 1979. **8**: 499-537.
30. Rojas, A.H., L.; Pereda, R.; Mata, R., *Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants*. J. of Ethnopharmacol., 1992. **35**: 275-283.
31. Oviedo-Chávez, I., Ramírez-Apan, T., Soto-Hernández, M., Martínez-Vázquez, M., *Principles of the bark of Amphipterygium adstringens (Julianaceae) with anti-inflammatory activity*. Phymed., 2004. **11**(5): 436-445.
32. McKenna, G.P.G., E.E.; Delgado, J.N., *Anticancer activity of Amphipterygium adstringens*. J. of Pharmaceut. Sci., 2002. **51**: 901-905.

33. Daneri-Navarro, A.D.T.-A., A.; García-Velasco; Del Toro-Arreola, S; Orbach-Arbouys, S.; Bravo-Cuéllar, A., *L5178Y Lymphoma associated immunosupresion in BALB/c mice*. Biomed & Pharmacother., 1995. **49**: 39-44.
34. Puebla-Pérez, A.V.-P., JM.; Sandoval-Ramírez, L.;Rodríguez-Aguilar, MP.; Gallegos-Arreola, MP.; Villaseñor-García, MM., *IL-10 and TGF- β Immunosuppressive Molecules in Mice with L5178Y*. Clinical and Investigative Medicine., 2004. **27**: 184D.
35. Palacios-Corona, R., Ortiz-Navarrete, V., Said-Fernández, S., Rodríguez-Padilla, C., González-Garza, M., *Detection of a Factor Released by L5178Y Lymphoblasts That inhibits Mouse Macrofage-Activation Induced by Lipopolisaccharides*. Archives of Medical Research., 1999. **30**: 298-302.
36. Lindequist, U.N., T.; Jülich, D., *The pharmacological Potential of Mushrooms*. ECAM., 2005. **2**(3): 285-299.
37. Miller, S., *Echinacea: A Miracle Herb against Aging and Cancer?*. ECAM., 2005. **2**(3): 309-314.
38. Wayne W. Daniel, Bioestadística, Limusa Wiley, 4ª Edición, México, 2006. 678-696.

TESIS/CIICBA